

# PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE ADN A PARTIR DE SANGRE COAGULADA DE AVES.

Arcia, José L.\*<sup>1</sup>, Márques, Alexis F.\*<sup>2</sup>, De la Rosa, Oscar.\*<sup>2</sup> y Galíndez, Rafael.\*<sup>3</sup>

\*<sup>1</sup>Universidad Rómulo Gallegos. \*<sup>2</sup>Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). \*<sup>3</sup> Universidad Central de Venezuela. Correo electrónico: Jarcia@unerg.edu.ve

## RESUMEN.

Con la finalidad de aislar ADN genómico de forma económica y segura, a partir de muestras de sangre coagulada de aves, para realizar estudios de genética molecular, se optimizó el siguiente protocolo: se tomaron 250 µL de coagulo de sangre, se agregaron 400 µL de buffer de lisis celular (10mmol/L Tris-HCl, pH 8,0; 10mmol/L KCl; 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 2mmol/L EDTA, pH 8,0; 0,4 mol/L NaCl y 10g/L SDS) y se dejó incubar hasta el día siguiente a temperatura ambiente. Se añadieron 350 µL de cloroformo y se agitó por 10 segundos, después se añadieron 350 µL de acetato de potasio, se agitó por 10 segundos y se centrifugó por 10 minutos (14.000g – 16.000g). El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos, se agregaron 700 µL de isopropanol, se centrifugó por 5 minutos (14.000 g – 16.000 g) y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 700 µL de etanol 70% c/u, se centrifugó por 5 minutos y se descartó el líquido. El sedimento se secó 10 min a 45°C y 8 min a 65°C para después rehidratar con 20 – 25 µL de TE-1X. La concentración y pureza del ADN aislado se determinó por espectrofotometría a 260 nm, mostrando un promedio de 2.288,12 ng/µL y 2,04 respectivamente. La idoneidad del ADN se evaluó mediante amplificación por PCR de los marcadores genéticos moleculares MCW0241 (274 pb y 278 pb) y LEI0122 (310 pb y 306 pb). El procedimiento descrito permitió obtener ADN de buena calidad y en grandes cantidades de forma simple, confiable y económica.

**Palabras Claves:** ADN, sangre coagulada, marcador genético.

## Abstract.

In order to isolate genomic DNA economically and safely, from coagulated blood samples, to perform molecular genetic studies, the following protocol was optimized: 250 µL of blood clot were taken, 400 µL of cell lysis buffer was added (10mmol / L Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol / L KCl; 10 mmol / L MgCl<sub>2</sub>; 2mmol / L EDTA, pH 8.0; 0.4 mol / L NaCl and 10 g / L SDS) and allowed to incubate overnight at room temperature. 350 µL of chloroform was added and stirred for 10 seconds, and then 350 µL of potassium acetate was added, stirred for 10 seconds and centrifuged for 10 minutes (14,000 g - 16,000 g). The supernatant was transferred to new tubes, 700 µL of isopropanol was added, centrifuged for 5 minutes (14,000 g - 16,000 g) and the supernatant discarded. Two washes were carried out with 700 µL of 70% ethanol each, centrifuged for 5 minutes and the liquid was discarded. The sediment was dried 10 min at 45°C and 8 min at 65°C and then rehydrated with 20-25 µL TE-1X. The concentration and purity of the isolated DNA was determined by spectrophotometry at 260 nm, showing an average of 2288.12 ng / µL and 2.04 respectively. The suitability of the DNA was evaluated by PCR amplification of the molecular genetic markers MCW0241 (274 bp and 278 bp) and LEI0122 (310 bp and 306 bp). The procedure described allowed to obtain DNA of good quality and in large quantities in a simple, reliable and economical way.

Key words: DNA, coagulated blood, genetic marker.

## INTRODUCCIÓN

El ADN constituye la materia prima fundamental en los análisis rutinarios de los estudios de genética molecular y puede ser extraído de distintas fuentes tales como tejidos y sangre de los organismos vivos. La extracción de ADN a partir de sangre tiene muchas ventajas, sin embargo, en algunos casos se hace necesario manejar gran cantidad de muestras las cuales deben ser preservadas de manera adecuada. En

algunas ocasiones, la sangre se puede dañar debido a fallas en el proceso de conservación lo cual obligaría a repetir la toma de muestras y en el peor de los casos, puede ocasionar la pérdida definitiva del ADN.

Para reducir el volumen de sangre recogida para pruebas de laboratorio, algunos autores han desarrollado metodologías para aislar ADN a partir de coágulos de sangre. Sin embargo, estas técnicas pueden ser difíciles o poco prácticas y puede requerir el uso de costosos instrumentos y equipos de laboratorio. Otras técnicas consumen mucho tiempo o requieren el uso de muchos reactivos importados que suelen ser costosos y difíciles de adquirir. En el presente estudio, se ha optimizado un procedimiento no enzimático para la extracción eficiente de ADN genómico de forma económica y segura, a partir de muestras de sangre coagulada, para realizar estudios de genética molecular.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Las aves utilizadas en el estudio forman parte de las razas de gallinas reproductoras venezolanas IPA y FAGRO las cuales pertenecen al Laboratorio de la Sección de Aves de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, municipio Girardot, Estado Aragua. Las muestras de sangre fueron tomadas de 33 individuos de cada raza y 95 individuos F<sub>1</sub> producto del cruzamiento entre estas. Estas muestras fueron tratadas con EDTA y conservadas a -20 °C durante seis meses, los resultados se compararon contra 10 muestras de sangre fresca conservada con EDTA, la cual fue procesada siguiendo el protocolo de extracción, propuesto por De la Rosa *et al.* (2013). Los análisis moleculares se realizaron en los Laboratorios de Biotecnología Agrícola del INIA-CENIAP y en el Centro de Investigación de Biotecnología Agrícola (CIBA), adscrito a la Coordinación de Investigación, de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.

### **Aislamiento de ADN**

Usando una espátula (la espátula fue limpiada tres veces con 700 mL de etanol /L y 9 g/L de NaCl entre muestras para evitar la contaminación cruzada) se tomaron fragmentos de coágulo de 250 µL y se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL. Después se agregaron 400 µL de buffer de lisis celular (10mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 10mmol/L KCl, 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2mmol/L EDTA, pH 8,0, 0,4 mol/L NaCl y 10g/L SDS), se agitó por inversión y dejó incubar hasta el día siguiente a temperatura ambiente. Las proteínas celulares se separaron por precipitación, después de la adición de 350 µL de fenol:cloroformo:isosamyl alcohol (25:24:1), se agitó por 10 segundos y se agregaron 350 µL de acetato de potasio (agitar por 10 segundos). Después de centrifugar por 10 minutos (14.000 g – 16.000 g) se tomó el sobrenadante y se transfirió a tubos nuevos. El ADN se aisló por precipitación al añadir 700 µL de isopropanol y centrifugar por 5 minutos (14.000 g – 16.000 g) para después descartar el sobrenadante. El sedimento obtenido se lavó con 700 µL de etanol al 70% y se centrifugó por 5 minutos, se descartó el líquido y se repitió el paso anterior. Después se descartó el líquido y se secó 10 min a 45°C y 8 min a 65°C, finalmente se rehidrató con 20 – 25 µL de TE-1X.

La concentración y pureza del ADN se verificó por espectrofotometría a 260 nm utilizando un Nano-drop modelo MD 2000 (Thermo Scientific). La integridad de las muestras de ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% previa tinción con SYBR SAFE (DNA gel stain 10.000X) a razón de 2 µL/100 mL de gel. La idoneidad del ADN obtenido se evaluó mediante amplificación por PCR de los marcadores genéticos moleculares (Eurofins MWG Operon) MCW0241 (274 pb y 278 pb) y LEI0122 (306 pb y 310 pb) que en otros estudios han sido asociados con la madurez sexual y peso del huevo respectivamente (Sasaki *et al.* 2004; Goraga *et al.* 2011). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis horizontal en un gel agarosa al 3% (Scientific Trade Corp), utilizando una cámara de electroforesis (Sigma - Aldrich) de 60 mL. La fuente de poder de la cámara se calibró a 65 voltios y la electroforesis tuvo una duración de 80 minutos. Posteriormente se realizó la electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 6%, preparados con una relación 19:1 (acrilamida/bisacrilamida). Las muestras se mezclaron con 5 µl de buffer de corrida (azul de bromofenol/sigma 114391-5G, glicerol/sigma G7757 y agua destilada estéril) y después se desnaturalizaron (95°C por 10 minutos) en un termociclador BIO-RAD PTC-100, posteriormente se colocaron en un bloque frío con la finalidad de dar un choque térmico y evitar así la formación de fragmentos inespecíficos. Una vez que la placa de la cámara para electroforesis alcanzó una temperatura de 45°C, las muestras se cargaron en el gel a razón de 2 µL por pozo, usando un peine de 38 puestos. Se utilizaron 1,5 µL del marcador de peso molecular de 25 pb (457 µg/ml de Promega D1501). Las condiciones de la cámara fueron: 45 Wattios y 2000 voltios durante 90 minutos. Posteriormente las imágenes de los geles se visualizaron primero en un trans-iluminador de luz blanca UPLAND modelo 91786, lo cual permitió mediante la observación directa, discriminar el genotipo del individuo según la distancia recorrida y el número de bandas de ADN presentes (aa; ab; bb). Posteriormente se realizó la determinación de los pares de bases utilizando un digitalizador de imágenes a través del programa UVITEC, UV Band tomando como referencia el marcador de peso molecular de 25 pb.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los fragmentos de los QTL's MCW0241 (sentido 5'-aaccagtttgtaacatcagc-3' y anti-sentido 5'- attggagttggtaccatacttc-3') y LEI0122 (sentido 5'- aatccctatagaactttgtgc -3''y anti - sentido 5'-gatcttactggattaccattc -3') se llevó a cabo en un equipo termociclador de tiempo final (Thermo Scientific).

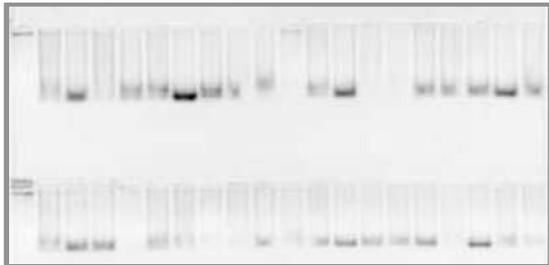
### Cuadro 1. Concentración y Volumen de los componentes para el medio de reacción de las PCR.

Reactivo	Concentración (1X)	Volumen (1X)
Buffer	1X	4 µl
MgCl <sub>2</sub>	3,0 mM	2,4 µl
DNTP's	0,3 mM	0,6 µl
Oligo F	0,25 mM	0,5 µl
Oligo R	0,25 mM	0,5 µl
Polimerasa	0,6 U	0,12 µl
ADN	80 ng	4 µl
H <sub>2</sub> O		7,88 µl
Vol. final		20 µl

El perfil térmico usado para la amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial de 94°C (5 min), 30 ciclos de: 94°C (1 min), 52,5°C – 62,9 °C (20 seg), 72°C (25 seg), extensión final de 72°C (7 min). El medio de reacción se preparó para un volumen final de 20 µl por reacción, según la formulación que se presenta en el Cuadro 1.

## RESULTADOS.

En la Figura 1 se puede apreciar la imagen obtenida después de la electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, en la mayoría de los casos se observaron bandas de ADN con buena integridad.



**Figura 1:** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de las muestras de ADN.

Por otra parte, se pudo observar que el 91 % de las diluciones mostraron la presencia de bandas de amplificación correspondientes a los QTL's que se utilizaron en el estudio, este resultado es superior al observado por Saldaña y Hung (2015), quienes compararon la eficiencia de dos métodos para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre en aves domésticas y solo lograron la amplificación por PCR del 23% de las diluciones para un método y 77% para el segundo método. Los valores de concentración obtenidos para las muestras de sangre coagulada oscilaron entre 211,7 ng/µL y 10.243,1 ng/µL con una media no ponderada de 2.288,12 ng/µL, estos valores superaron a los obtenidos en este mismo estudio para las muestras de sangre fresca donde se observó una concentración promedio de 972,02 ng/µL (Cuadro 2).

**Cuadro 2: Concentración y relación de pureza del ADN.**

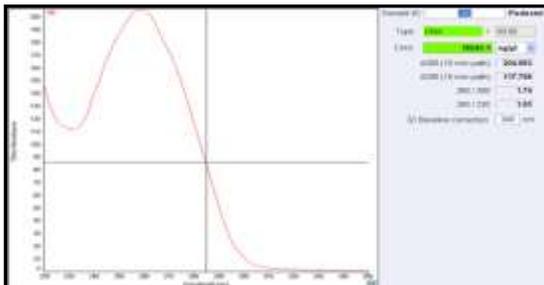
Muestras	Concentración de ADN ng/µL	Relación 260/280
Sangre fresca	972,02*	1,26 - 1,97
Sangre coagulada	2288,12*	1,74 - 2,04

\*: Promedios no ajustados

Los valores de concentración obtenidos, también fueron superiores a los observados por Saldaña y Hung (2015), quienes compararon un método de extracción usando un Kits comercial y el método de fenol-cloroformo y reportaron valores promedios de 9,10 ng/µL para el primer método y 232,47 ng/µL para el segundo. Por otra parte, Saldaña *et al.* (2007), evaluaron tres métodos enzimáticos para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre de bovinos utilizando solventes orgánicos (fenol, cloroformo y alcohol isoamílico) y una resina quelante (Chelex 100) y obtuvieron valores de

concentración que oscilaron entre 48 ng/μL y 224 ng/μL. Evaluaciones hechas por otros investigadores usando distintos procedimientos para la extracción de ADN (enzimáticos, mecánicos y químicos) a partir de sangre fresca y coagulada de diferentes especies, arrojaron valores que oscilaron entre 5,8 μg y 224 μg con un promedio no ponderado de 75,05 μg (Salazar *et al.*, 1998; Riera *et al.*, 2010; Monroy *et al.*, 2014 y Chang *et al.*, 2015).

El nivel de pureza (relación 260/280) se determinó mediante espectrofotometría y en este caso, osciló entre 1,74 y 2,04, valor que ubica este resultado dentro del rango de pureza óptima (Figura 2) según los estándares de calidad para ADN establecidos por el Banco Nacional de ADN de la universidad de Salamanca (García, 2014).

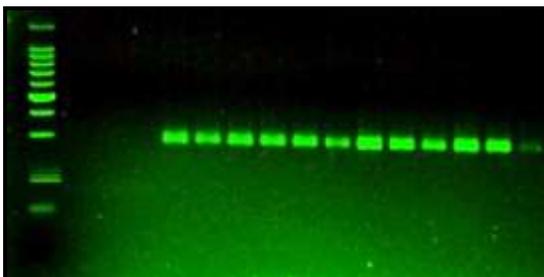


**Figura 2.** Curva de calidad y concentración de las muestras de ADN.

El nivel de pureza logrado con este protocolo es superior al reportado por otros investigadores para distintos procedimientos de extracción los cuales se ubicaron entre 1,30 y 1,74 (Salazar *et al.*, 1998; Saldaña *et al.*, 2007; Riera *et al.*, 2010 y López y Mejía, 2012; Monroy *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015 y Saldaña y Hung, 2015) y demuestra la eficiencia del protocolo para eliminar los restos de hemoglobina.

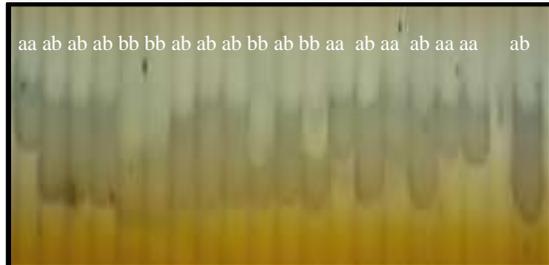
### **Electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida.**

La idoneidad del ADN obtenido se validó mediante amplificación por PCR de los marcadores genéticos moleculares MCW0241 y LEI0122. Los productos de la PCR se sometieron primero a electroforesis horizontal en gel agarosa al 3% (Figura 3), posteriormente se realizó una segunda PCR y en este caso los amplificados fueron sometidos a una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 6% (Figura 4).



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% del marcador genético molecular MCW0241.

En las figuras 3 y 4 se pueden apreciar las imágenes obtenidas después de las corridas de electroforesis, en ambos casos se pueden observar bandas de ADN con buena integridad en la gran mayoría de las muestras. La región de los QTL's MCW0241 y LEI0122 se amplificaron fácilmente de ambos preparados de ADN y no se observó evidencia de contaminación cruzada de las muestras. Estos resultados muestran que el ADN puede ser extraído de manera eficiente de muestras de sangre líquida o coagulada, incluso después de un almacenamiento prolongado.



**Figura 4.** Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida del marcador genético molecular LEI0122 (310 pb – 306 pb).

## CONCLUSIÓN

En conclusión, el protocolo descrito permitió obtener ADN ideal para los estudios de genética molecular. La extracción se puede realizar a partir de sangre fresca o coagulada y el producto obtenido es de buena calidad y en grandes cantidades. La metodología es simple, confiable y económica.

## Agradecimientos

Los autores manifiestan su agradecimiento al Instituto de Producción Animal (IPA) de la Universidad Central de Venezuela por permitir el uso de los ejemplares de la sección de aves, así como de los Laboratorios de Biotecnología Agrícola del INIA-CENIAP y el Centro de Investigación de Biotecnología Agrícola (CIBA), de la Universidad Central de Venezuela por el apoyo logístico brindado para la toma de muestras y la realización de los ensayos de laboratorio que permitieron la culminación del presente protocolo.

## REFERENCIAS

- Chang, A., Morera L., Ustariz, C., Bencomo, C. Y Hernández, A. 2015.** Optimización de la extracción de ácido desoxirribonucleico para la tipificación molecular de antígenos leucocitarios humanos. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 31(1):59-64. Consulta en línea, disponible en; [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892015000100007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892015000100007)
- De La Rosa, O., Márques, A., Vásquez, B., Seijas, G. y Dickson, L. 2013.** Optimización de un protocolo para aislamiento de ADN a partir de sangre periférica en bovinos. Paper presented at the 2do Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación. LOCTI - PEII, Caracas.
- García, M. A. 2014.** Taller 3: Controles de calidad. Cuantificación del ADN. “Diferencia entre espectrofotometría UV y fluorimetría”. Banco Nacional de ADN Carlos III.

Universidad de Salamanca. España. Consulta en línea, disponible en; [www.bancoadn.org](http://www.bancoadn.org) [bancoadn@usal.es](mailto:bancoadn@usal.es) FO-00.03-2

**Goraga, Z. S., Nassar, M. K y Brockmann, G. A. 2011.** Quantitative trait loci segregating in crosses between New Hampshire and White Leghorn chicken lines: I. egg production traits. *Animal Genetics*, 43, 183–189

**López, L. y Mejía, G. 2012.** Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Rev.MVZ Córdoba* 17(3):3169-3175.

**Monroy, V., Fernández, A., Díaz, R., Martínez, M., Illnait, Z. y Perurena, L. 2014.** Evaluación de cuatro métodos de extracción del ADN de *Histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR. *VacciMonitor*; 23(2):49-56. La Habana Cuba. Disponible en: [www.finlay.sld.cu/vaccimonitor.html](http://www.finlay.sld.cu/vaccimonitor.html)

**Riera, M., Rojas, M. y Zapata P. 2010.** Protocolo de extracción de DNA por *salting-out* para pequeños volúmenes de sangre. *Revista Ciencia y Tecnología*. Año 12 / N° 14 / 2010 / 4–7. Consulta en línea disponible en; <https://www.google.com/search?client=opera&q=Protocolo+ADN+sangre+coagulada&sourceid=opera&ie=UTF-8&oe=UTF-8>

**Salazar, L. A., Hirata, M. H., Cavalli, S. A., Machado, M. O. and Hirata. R. 1998.** Optimized Procedure for DNA Isolation from Fresh and Cryopreserved Clotted Human Blood Useful in Clinical Molecular Testing. *Clinical Chemistry* 44, No. 8. 1748-1750.

**Saldaña, J. A., Tamayo, A. C. y Rojas, W. A. 2007.** Extracción y cuantificación de ADN de bovinos de doble propósito escogidos mediante índices de selección en EARTH. *Tierra Tropical* 3 (1): 61-70

**Saldaña, K. y Hung, Armando. 2015.** Comparación del Sexaje por PCR usando muestras de ADN de sangre y plumas de aves domésticas. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 3(1), 10-12 Consulta en línea disponible en; [www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/STV/article/view/2677](http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/STV/article/view/2677)

**Sasaki, O., Odawara, S., Takahashi, H., Nirasawa, K., Oyamada, Y., Yamamoto, R., Ishii, K., Nagamine, Y., Takeda, H., Kobayashi, E and Furukawa, T. 2004.** Genetic mapping of quantitative trait loci affecting body weight, egg character and egg production in F2 intercross chickens. *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 35, 188–194